

Санкт-Петербургский Государственный университет

Биологический факультет

Кафедра цитологии и гистологии

Гаянова Мария Олеговна

Выпускная квалификационная работа бакалавра

Участие белка теплового шока 70кДа в эпителиально-
мезенхимальном переходе.

Работа выполнена в Лаборатории защитных
механизмов клетки ФГУБН Института цитологии РАН

Заведующая лабораторией д.б.н. Гужова И. В.

Научные руководители: Никотина А.Д

Корнилова Е. С.

Санкт-Петербург

2018

Оглавление

Список сокращений.....	4
Введение.....	5
Обзор литературы.....	5
Глава 1. Эпителиально-мезенхимальный переход	6
1.1 Типы эпителиально мезенхимального перехода.....	7
1.2 Маркеры эпителиально-мезенхимального перехода	8
E (epithelial)-кадгерин	9
N (neural)-кадгерин	10
Виментин.....	11
Smad	11
Snail (SnaiI), Slug (SnaiII).....	12
Zeb1, Zeb2.....	12
Twist1, Twist2.....	13
Глава 2. Семейство белков теплового шока 70 кДа HSP70	13
2.1 Строение.....	14
2.2 Функции HSP70.....	15
Стресс-индукция HSP70	15
АТФ-азный цикл.....	15
2.3 HSP70 в опухолевых клетках.....	16
Внутриклеточный HSP70.....	16
Апоптоз.....	16
Физиологическое старение	17
Мембранный HSP70	17
Свободный HSP70	18
2.4 HSP70 в EMT	19
HSP70 в EMT здоровых тканях и при фиброзе	19
HSP70 в Emt в опухолевых клетках.....	20
Материалы и методы.....	21
1. Культивирование клеток.....	21
2. Бактериальная трансформация с помощью RbCl.....	22
3. Клеточная плазмидная трансфекция	24
4. Лентивирусная трансдукция клеточной линии DLD1 с помощью полибрена	24
5. Выделение РНК из клеточных лизатов.....	26

Получение кДНК с помощью обратной транскрипции	26
Количесвенный ПЦР в реальном времени;	26
7. SDS-PAGE электрофорез по Лэммли и Вестернблоттинг.....	27
6. Тест оценки миграции (заращение царапины).....	28
Результаты и обсуждения	28
1. Получение клеточной линии DLD1 с пониженным содержанием HSP70 с помощью лентивирусной трансдукции.....	28
2. Получение клеточной линии DLD1 с повышенным содежанием snail с помощь плазмидной трансфекции pcDNA3 Snail	30
3. Количественная оценка уровня экспрессии Snail и Slug методом qPCR в полученных сублиниях.....	31
Выводы	34
Список литературы.....	34

Список сокращений

EMT – epithelial to mesenchymal transition (эпителиально-мезенхимальный переход)

ECM- extra cellular matrix (внеклеточный матрикс)

MET – mesenchymal to epithelial transition (мезенхимально-эпителиальный переход)

HSE – heat shock element (элемент теплового шока)

HSP – heat shock protein (белок теплового шока)

TGF – transforming growth factor (трансформирующий ростовой фактор)

EGF – epidermal growth factor (эпидермальный фактор роста)

NBD - nucleotide binding domain (нуклеотид связывающий домен)

SBD - substrate binding domain (субстрат связывающий домен)

HDAC3 - histone deacetylase 3 (гистон-деацетилаза 3)

CtBP - C-концевой связывающий белок

MMP - матриксные металлопротеазы

TEM- transendothelial migration (трансендотелиальная миграция)

AGE - advanced glycation end-products (s) (конечные продукты гликозилирования)

FGF – fibroblast growth factor (фактор роста фибробластов)

Введение

Последние годы интерес к изучению процесса метастазирования растёт, поскольку оно является основной причиной высокой смертности при опухолевых заболеваниях эпителиальных тканей.

Первым этапом процесса метастазирования является эпителиально-мезенхимальный переход, в ходе которого эпителиальные клетки приобретают мезенхимальный фенотип, теряют плотные и адгезионные межклеточные контакты, происходит перестройка цитоскелета, позволяющая им активно перемещаться, а также они начинают синтезировать ферменты, которые способны деградировать внеклеточный матрикс, что позволяет им проходить через базальную мембрану и распространяться по сосудистому руслу в дистальные органы. В инициации и элонгации EMT задействованы различные молекулярные процессы.

Основной трудностью для эффективной противоопухолевой терапии без деструктивного воздействия на здоровые ткани является высокоактивная цитопротекторная система в опухолевых клетках. Одним из основных участников этой системы защиты является белок теплового шока 70кДА (HSP70). Это многофункциональный стресс-индуцируемый белок, повышенное количество которого в цитозоле клеток коррелирует с неблагоприятным прогнозом для пациента.

Роль, HSP70 в EMT остается малоизученной. Существуют данные о прямом блокировании HSP70 процесса EMT, но все эти исследования касаются изучения EMT в аспекте заживления ран, регенерации тканей и фиброза органов. С другой стороны, существуют исследования, которые косвенно подтверждают, что HSP70 способен стимулировать EMT на моделях метастазирующих опухолевых клеток.

Целью нашего исследования является изучение роли белка теплового шока HSP70 в эпителиально-мезенхимальном переходе.

В рамках данной цели были поставлены следующие задачи:

- ❖ Получить клеточную линию с пониженной экспрессией HSP70
- ❖ Разработать клеточную модель EMT, основанную на трансфекции клеточной линии DLD1 вектором с повышенной экспрессией SNAIL.
- ❖ Провести количественный анализ EMT-маркеров Snail и Slug.

- ❖ Провести анализ миграционной характеристики клеток.

Обзор литературы

Глава 1. Эпителиально-мезенхимальный переход

Эпителиально-мезенхимный переход (EMT) представляет собой биологический процесс, который позволяет эпителиальной клетке, которая обычно взаимодействует с базальной мембраной, подвергаться множественным биохимическим изменениям, позволяющим ей приобрести фенотип мезенхимной клетки. Мезенхимальный фенотип включает в себя: усиление миграционной способности, инвазивности, повышенную резистентность к апоптозу, синтез ферментов, разрушающих внеклеточный матрикс. Последние позволяют клетке покинуть место ее изначальной локализации и выйти в кровяное русло. (Kalluri and Weinberg 2009)

Мезенхимальные клетки могут претерпевать мезенхимально-эпителиальный переход (MET), который является процессом, обратным EMT. Было показано что в течении эмбриогенеза, во время развития органов, клетки могут проявлять высокую пластичность, сменяя эпителиальные и мезенхимальные состояния с помощью EMT и MET. Ранее предполагали, что существует терминальная дифференцировка, после прохождения которой клетка завершает свое развитие. Но эта концепция была опровергнута серией исследований, в которых терминально дифференцированные клетки претерпевали трансдифференцировку проходя EMT программу.

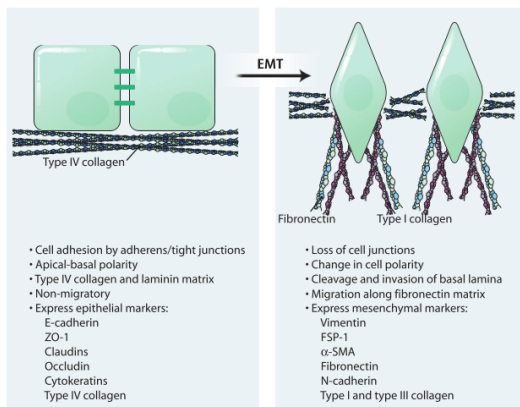


Рис 1. Изменения, происходящие при эпителиально-мезенхимальном переходе (Gonzalez 2014)

1.1 Типы эпителиально мезенхимального перехода

Превращение эпителиальных клеток в мезенхимальные происходит на разных этапах эмбрионального развития, так и во взрослом организме. Можно выделить 3 разных типа EMT:

1. Тип 1 EMT имеет место при эмбриональном развитии. Формируются первичные мезенхимальные клетки, которые впоследствии могут подвергаться MET для формирования вторичного эпителия. (Hay 2005)
2. Тип 2 EMT, связан с заживлением ран, регенерацией тканей и фиброзом органов. При EMT этого типа, переход начинается как часть событий, связанных с репарацией, которые обычно инициируются фибробластами и другими клетками, чтобы восстановить ткани после травмы или воспаления. Однако, EMT типа 2 прекращается после ослабления воспаления, при заживлении ран и регенерации тканей. При фиброзе органов, EMT типа 2 не приостанавливается, и в конечном итоге, приводит к разрушению органа. Фиброз ткани - это, по существу, неослабевающая форма заживления ран. (Kalluri and Weinberg 2009)
3. Тип 3 EMT происходит в опухолях, при предварительных нарушениях в онкогенах и гены-супрессорах опухолей, запускается программа EMT, значительно отличающаяся от программ EMT других типов. Клетки прошедшие EMT типа 3, способны к инвазии метастазированию.

Важно отметить, что раковые клетки могут проходить через EMT в различной степени. Некоторые клетки сохраняют многие эпителиальные признаки, приобретая некоторые мезенхимальные, в то время как другие клетки, теряют все признаки их эпителиального происхождения становясь полностью мезенхимальными. (Potenta, Zeisberg, and Kalluri 2008)

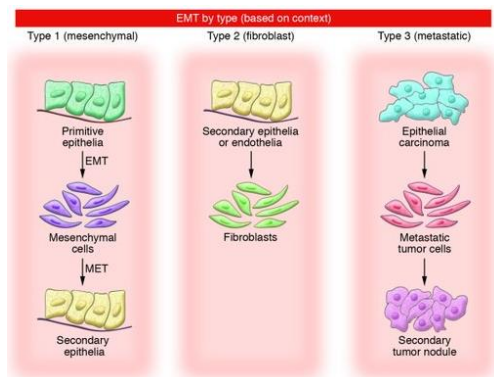


Рис 2. Различные типы эпителиально-мезехимального перехода. (Zeisberg and Neilson 2009)

1.2 Маркеры эпителиально-мезенхимального перехода

В процессе инициации и элонгации ЕМТ задействованы различные молекулярные процессы. Они включают в себя: активацию транскрипционных факторов, экспрессию специфических белков клеточной поверхности, реорганизацию и экспрессию цитоскелетных белков, синтез ферментов, деградирующих внеклеточный матрикс (ЕСМ) и изменение экспрессии некоторых микроРНК.

Во многих случаях задействованные факторы также используются в качестве биомаркеров для демонстрации прохождения клетки через ЕМТ.

Поскольку в активации программ ЕМТ участвуют многочисленные факторы транскрипции, не удивительно, что во время перепрограммирования эпителиальных клеток наблюдался множество фенотипов. Имеются также данные свидетельствующие о том, что факторы, индуцирующие ЕМТ, взаимодействуют друг с другом в синергетической манере и используют общие пути, однако некоторые исследования показывают, что ингибирование одного транскрипционного фактора является достаточным для блокировки ЕМТ. (Xie et al. 2004) Ниже перечислены несколько основных маркеров ЕМТ.

Маркеры	
Эпителиальные	E-кадгерин
Мезенхимальные	N-кадгерин
	Виментин
Транскрипционные факторы	
Мезенхимальные	Snail (Snail)
	Slug (Snail)
	Zeb1
	Zeb2
	E47
	ZLF8
	Twist

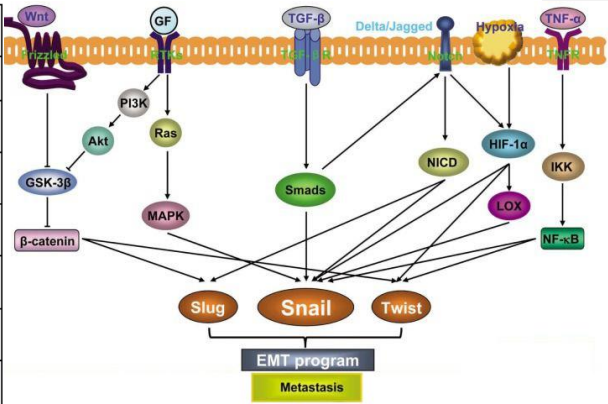


Рис 3. Маркеры эпителиально-мезенхимального перехода. (Polireddy and Chen 2016)

E (epithelial)-кадгерин

Е-кадгерин – Ca^{2+} -зависимый белок клеточной адгезии, необходимый для образования эпителия в процессе эмбриогенеза. Присутствует почти во всех эпителиальных клетках, гомофильно взаимодействуя сам с собой в адгезионных клеточных контактах, (Derycke and Bracke, 2004) обеспечивая формирование всего комплекса межклеточных контактов эпителиальных клеток. (Meigs et al. 2002). Подавление экспрессии Е-кадгерина снижает силу клеточной адгезии, что приводит к увеличению подвижности клеток (Weinberg 2006) и часто наблюдается во время инвазии опухолевых клеток и образования метастазов (Heimann et al., 2000).

Существует несколько механизмов потери функции Е-кадгерина во время опухолевого генеза: мутации, или эпигенетические механизмы, такие как гиперметиличирование промотора или транскрипционная репрессия гена. Различные транскрипционные факторы, такие как Snail, SIP-1 и Slug, опосредующие EMT, подавляют синтез Е-кадгерина, (Huber et al, 2005). Считается, что снижение экспрессии Е-кадгерина является ключевым событием в эпителиально-мезенхимальном переходе. Так у мышей с делецией Е-кадгерина образуются

мигрирующие дольковые карциномы, кроме того было показано что утрата E-кадгерина коррелирует с прогрессированием карцином и плохим прогнозом для пациента. (Hirohashi 1998). Трансфекция высоко инвазивных клеточных линий эпителиальных опухолей с помощью кДНК E-кадгерина частично отменяет их потенциал инвазивности.

Однако утрата только E-кадгерина не обязательно указывает на мигрирующий фенотип опухоли. Так, карциномы молочной железы с низким содержанием клаудина (критический компонент плотных контактов), но сохраняющие высокий уровень экспрессии E-кадгерина, параллельно с высоким уровнем транскрипционных факторов, индуцирующих EMT, таких как Snail1, Twist и ZEB2, отличаются высокой миграционной способностью. (Prat et al. 2010)

N (neural)-кадгерин

Также, как и E-кадгерин является трансмембранным, Ca^{2+} -зависимым гомофильным белком, который также способен к гетерофильным взаимодействиям, опосредующим клеточную адгезию. Часто процесс EMT ассоциируется с переключением экспрессии с E-кадгерина на N-кадгерин.

В раннем эмбриогенезе N-кадгерин встречается в мезодерме, позднее он присутствует в нервной ткани, в хрусталике глаза и нескольких других эпителиальных тканях. У взрослого человека экспрессия N-кадгерина в основном ограничена нервной тканью, сетчаткой, эндотелиальными клетками, фибробластами и миоцитами. (Derycke and Bracke, 2004).

Усиление экспрессии N-кадгерина часто наблюдается при карциномах, и его принудительная экспрессия способствует подвижности и метастазированию клеток предстательной железы и рака молочной железы. (Ramis-conde et al. 2009)

Одно из наиболее критических событий, опосредованных N-кадгерином - трансэндотелиальная миграция (ТЕМ), которая осуществляется за счет его способности к гетерофильным взаимодействиям. Чтобы изучить механизм ТЕМ опухолевых клеток Qi et al. провели анализ миграции *in vitro*. Они использовали камеры из матригеля для создания искусственного эндотелия и показали, что раковые клетки осуществляют ТЕМ атакуя эндотелиальный слой с помощью N-кадгерина.

Однако N-кадгерин также осуществляет функции, не связанные с его адгезионной активностью. Согласно некоторым исследованиям (Tran et al. 2002), N-кадгерин усиливает взаимодействие фактора роста фибробластов (FGF) с рецептором FGFR который инициирует

сигнал трансдукции, тем самым индуцируя сигнальные каскады, которые способствуют миграции и инвазии клеток. (Tran et al. 2002),

Кроме того, N-кадгерин способствует выживанию клеток и защищает раковые клетки от апоптоза, активируя фосфатидилинозитол 3-киназу (PI3K) – АКТ. (Kou et al. 2016)

Виментин

Виментин – белок относящийся к III классу цитоплазматических промежуточных филаментов (Fuchs and Weber, 1994) повсеместно экспрессирующийся в клетках мезенхимального происхождения поддерживая клеточную целостность и обеспечивая устойчивость к стрессу.

Во время эмбрионального развития мышцы он экспрессируется в клетках, которые мигрируют из эмбриональной эктодермы (Franke et al., 1982) и в нервном гребне клеток (Co-chard and Paulin, 1984). Общей чертой этих клеток является то, что они все подвижные.

Повышенная экспрессия виментина в опухолевых клетках коррелирует опухолевой инвазией и плохим прогнозом для многих типов рака.

Scrb, белок, участвующий в миграции клеток, защищен от протеасомальной деградации при взаимодействии с виментином, предполагая, что усиление vimentin во время EMT приводит к стабилизации Scrb, тем самым способствуя направленной миграции клеток и увеличивая инвазивную способность клеток. (Phua D 2009)

Было показано, что виментин является регулятором рецепторной тирозинкиназы Axl и усиливает клеточную миграцию путем индуцирования экспрессии Axl. Кроме того, Slug и Ras индуцированные изменения EMT, как было показано, приводят к повышению активности виментина. (Vuoriluoto K, 2011)

Виментин как сообщается, является сигнальной мишенью PI3K, активация которых приводит к фосфорилированию виментина, которое необходимо для эффективной EMT. (Barberis 2009)

Таким образом виментин является не только структурным белком, но и активным участником различных сигнальных каскадов.

Smad

Smads (или SMAD) семейство белков, которые являются основными преобразователями сигнала от рецепторов трансформирующего фактора роста (TGF- β). Они имеют критически важное значение для регуляции пролиферации и дифференцировки клеток в организмах от насекомых до млекопитающих.

Существует три различных подтипа Smads: рецептор-регулируемые Smads (R-Smads), common partner Smads (Co-Smads) и ингибирующие Smads (I-Smads). Всего 8 белков семейства Smad разделены между этими тремя группами. Тримеры двух рецептор-регулируемых SMAD и одного co-SMAD действуют как факторы транскрипции, которые регулируют экспрессию определенных генов. (Derynck and Feng, 1997)

Добавлено примечание ([АН1]): Везде должно быть одинаково написано. проследи

Как Smads передают сигнал -они временно взаимодействуют с активированным рецепторным комплексом фосфорилируются рецептором так, Smad2 и 3 фосфорилируются и активируются активинем и TGF- β рецепторами, тогда как Smad1, 5 и 8 активируются рецепторами BMP, после чего фосфорилированные рецептор-активированные Smads образуют комплексы со Smad4, которые затем транслоцируются в ядро, где они регулируют транскрипцию. (Darnell, 1997).

Snail (Snail), Slug (Snail)

Белки семейства Snail - транскрипционные репрессоры, играющие ключевую роль в регуляции EMT. Snail1 и Snail2 связывают промотор CDH1, кодирующий E-cadherin, чтобы подавить его транскрипцию. Накопление Snail1 в ядре связано с понижением экспрессии E-кадгерина, и с индукцией метастатических фенотипов. (PMЖ, гепатокарциномы)(Cano et al. 2000)

Snail2 играет ключевую роль в индукции EMT при метастазировании, и также принимает участие в гаструляции, развитии и миграции клеток нервного гребня.

Во время гаструляции у *Drosophila* (плодовой мушки) Snail взаимодействует с ко-репрессорами CtBP (C-концевой связывающий белок) и Ebi с образованием комплекса с гистон-деацетилазой 3 HDAC3 (34-36). Вместе эти белки инициируют переход от E-cadherin к N-cadherin, наличие которого характерно для мезенхимальных клеток. (Oda, Tsukita, and Takeichi 1998)

Zeb1, Zeb2

Семейство транскрипционных факторов ZEB играет важную роль в развитии нервного гребня, а также является регулятором прогрессирования рака.

ZEB1 и ZEB2 взаимодействуют с областями E-box ДНК, которые окружают ген CDH1. ZEB1 взаимодействует с Sirtuin1, модифицирует H3 гистон, уменьшая связывание РНК-полимеразы II с промотором CDH1.

Экспрессии белков ZEB в эпителиальных клетках молочной железы достаточно для диссоциации адгезионных контактов, предположительно посредством подавления экспрессии генов, кодирующих плакофин-2 и ZO-3, которые являются критическими для поддержания эпителиального фенотипа. (C. Vandewalle, J 2005).

ZEB1 и ZEB2 также увеличивают экспрессию генов, кодирующих матриксные металлопротеазы (MMP).

Также они препятствуют транскрипции некоторых microRNA, участвующих в процессах обратных EMT (MET), - miR-200, miR-141, связываясь с их промоторами в E-box. U. Burk (2008).

Twist1, Twist2

Twist1 и Twist2 играют важную роль в метастазировании. При определении вентральной борозды у дрозофилы экспрессия Twi и Sna (кодирующая Twist and Snail) увеличивается, а их соответствующие белковые продукты играют центральную роль в инвагинации вентральной мезодермы и расщеплении мезодермальных клеток.

Как было показано, Twis имеет важное значение для инициации экспрессии Drosophila N-кадгерина во время гаструляции (Oda et al, 1998) и сверхэкспрессия Twist-1 коррелирует с аномальной экспрессией мРНК N-кадгерина в диффузном типе человека рак желудка (Rosivatz et al, 2002).

В клетках молочной железы человека Twist1 связывает промотор SNAI2 и стимулирует его экспрессию, что индуцирует EMT.

Белок BMI1 (polycomb ring finger) действует совместно с Twist подавляя экспрессию E-cadherin и ингибитора клеточного цикла p16.

Кроме того, Twist1 отвечает за экспрессию нескольких микроРНК, которые опосредуют ингибирование экспрессии HOXD1 и его генов-мишеней. Одной из этих мишеней является RhoC, (семейство генов Ras), который опосредует механическую реорганизацию цитоскелета.(M. Yang et al. 2010)

Глава 2. Семейство белков теплового шока 70 кДа HSP70

Семейство белков теплового шока 70кДа – семейство широко распространенных высококонсервативных белков. Они являются важной частью аппарата фолдинга белка и защищают клетки от стресса.

У эукариот внутриклеточные белки Hsp70 выполняют многие задачи. Они могут взаимодействовать с возникающими полипептидами по мере их появления из рибосом или связываться со зрелыми белками, денатурированными в условиях стресса (Hartl and Hayer-Hartl 2002;).

Диапазон функций, выполняемых HSP70 вместе с ко-шаперонами (напр Hsp40) необычайно велик, в том числе: деградация в протеасомах, импорт в митохондрии, изменение конформации белков во время сигнальных событий и разборка белковых комплексов (Young et al., 2003a).

HSP70 стресс-индуцируемыми белками. Стресс усиливает образование агрегатов, что разрушает клеточный аппарат и может привести к гибели клеток. HSP70 обеспечивает правильный фолдинг; если рефолдинг невозможен, они направляют неправильно сложенные белки в протеасомную систему, где они деградируют.

Белки Hsp70 функционируют в основном в виде мономеров, хотя они могут временно контактировать с регуляторными ко-шапероновыми молекулами.

2.1 Строение

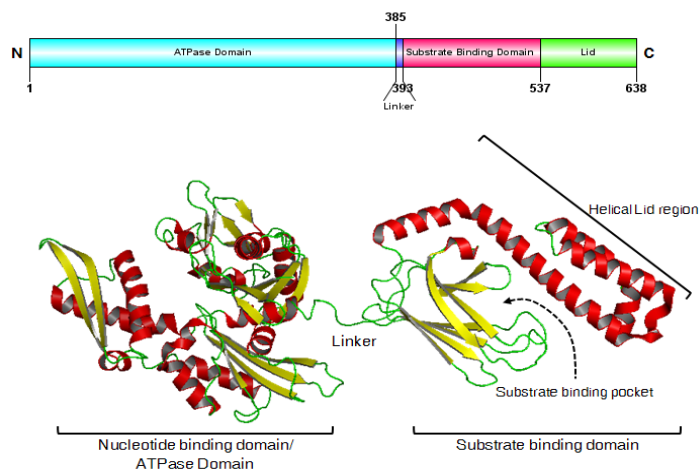


Рис. 4 Строение HSP70 (Mayer 2001)

Консервативная доменная структура HSP70 состоит из N-концевого нуклеотид-связывающего домена (NBD), обладающего АТФазной активностью и С-концевого субстрат-связывающего домена (SBD), соединенного консервативным линкером.

В связанном с АТФ состоянии HSP70 имеет низкое сродство к субстрату; при переходе в состояние, связанное с ADP, HSP70 связывает субстрат с высоким сродством. Этот основной механизм используется для выполнения многих клеточных функций белков HSP70.

NBD имеет два субдомена, образующих две лопасти с глубоким отверстием, образующим нуклеотид-связывающий карман.

SBD также содержит два субдомена, основание из β -листа с участком для полипептидного связывания и α -спиральную структуру, образующую крышку над сайтом связывания полипептида. Короткий гидрофобный участок полипептидной цепи связывается с пептид связывающим сайтом SBD (Zhu et al., 1996).

Конформационные изменения, происходящие в NBD, передаются в SBD. Связывание АТФ в NBD, способствует уменьшению сродства между основанием и крышкой в SBD, при этом открывается сайт связывания пептидов. Напротив, связывание полипептида в SBD также может передавать изменения в NBD, увеличивая скорость гидролиза АТФ (Bukau and Horwich 1998).

2.2 Функции HSP70

Стресс-индукция HSP70

Количество HSP70 составляют до 2-3% от общего количества клеточных белков, их экспрессия сильно возрастает при стрессе. Эта индукция опосредуется специфическими факторами транскрипции, называемыми факторами теплового шока (HSF). HSF-1, связывает ДНК в определенных участках, называемых элементами теплового шока (HSE), находящихся в промоторах генов HSP (Arrigo, 2005). В нормальных условиях HSF-1 секвестрируется в цитоплазме HSP70, HSP90 и несколькими ко-шаперонами (Voellmy, 2006; Conde et al., 2009). В стрессовых условиях HSPs высвобождает HSF-1 для связывания неправильно сложенных белков. HSF фосфорилируется, тримеризуется и мигрирует в ядро, взаимодействует с HSE и, наконец, индуцирует транскрипцию генов HSP. Этот основной механизм используется для выполнения многих клеточных функций белков Hsp70.

АТФ-азный цикл

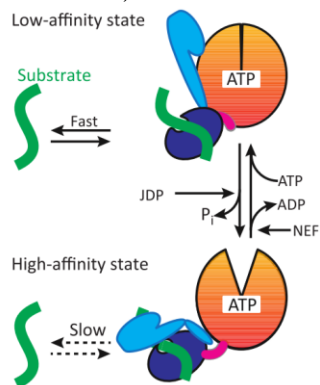


Рис 5. АТФазный цикл HSP70 (Mayer 2013)

Центральным для шаперонного цикла белков Hsp70 АТФ-зависимое балансирование между двумя состояниями (рис. 5). В первом случае, когда HSP70 связан с АТФ, ассоциация пептида с SBD и диссоциация пептида из SBD происходит с высокими скоростями, что приводит к довольно низкой аффинности HSP70 к субстрату. Во втором случае после гидролиза АТФ скорость ассоциации и диссоциации пептида снижается на несколько порядков, что приводит к увеличению сродства в более чем 10 раз. Schmid, D. et al. (1994) Kinetics of molecular chaperone action. Science 263

2.3 HSP70 в опухолевых клетках

Функции HSP70 в раковых клетках зависят от его локализации.

Внутриклеточный HSP70.

HSP70 часто сверхэкспрессируется в различных типах опухолей и накапливается в опухолевых клетках после воздействия стресса. Calderwood SK, Khaleque MA, Sawyer DB, Ciocca DR. 2006

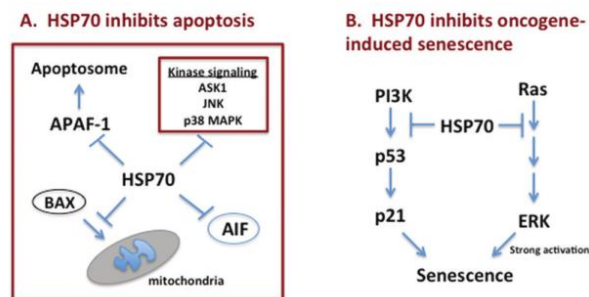


Рис. 6 Влияние HSP70 на апоптоз и старение опухолевых клеток

Существует несколько функций внутриклеточного HSP70 связанных с раком.

Апоптоз

Сверхэкспрессия HSP70 может обеспечить селективное преимущество выживания для опухолевых клеток частично из-за его способности ингибировать множественные пути гибели клеток, включая как внутренний, так и внешний апоптоз.

Что касается внутриклеточного пути апоптоза, HSP70 может напрямую связываться с проапоптотическим членом BCL2 семейства BAX и препятствовать его транслокации в митохондрии, где последний разрушает митохондриальные мембраны (Gotoh,T. et al. 2004)

Что касается внешнего пути, то в BCR-ABL-экспрессирующих клетках HSP70 связывается с рецепторами смерти DR4 и DR5, ингибируя сборку индуцирующих смерть сигнальный комплекс или DISC (Guo,F. et al. 2005)

HSP70 также ингибирует BH3-взаимодействующий доменный агонист, опосредованный агонистами, апоптоз ниже по течению от пути фактора некроза опухолей- α (Gabai,V.L. et al. 2002)

HSP70 связывает и ингибирует несколько индуцированных стрессом киназ, включая сигнальную регулируемую киназу, апоптоз, N-концевую киназу c-jun и митоген-активированную протеинкиназу p38; в каждом случае взаимодействие ингибирует способность киназы функционировать при апоптозе. (Park,H.S. et al. 2002)

Наконец, HSP70 ингибирует независимую от каспазы клеточную гибель, связывая непосредственно с апоптоз-индуцирующим фактором (AIF) и ингибируя AIF-индуцированную конденсацию хроматина (Ravagnan,L. et al. 2001)

Физиологическое старение

Было показано, что HSP70 также играет роль в контроле старения в опухолевых клетках. Нокдаун гена *hsp70* в опухолевых клетках, с использованием малой интерферирующей РНК может индуцировать клеточное старение, частично вызванное пониженной стабильностью MDM2 (убиквитин-лигаза для p53), а также сопутствующей стабилизации p53, соответственно активации активация гена-мишеней p53 - p21. (Yaglom,J.A. et al. 2007)

В целом, HSP70 явно играет защитную роль от p53-зависимого, так и для p53 независимого старения. Эта роль, вероятно, способствует выживаемости раковых клеток.

Мембранный HSP70

HSP70 содержится много и на поверхности опухолевых клеток. Он может взаимодействовать с липидными компонентами плазматической мембраны опухолевых клеток, например с глобоил-триазол-церамидом (Gb3) (Gehrmann M. 2008) входя в состав липидных рафтов плазматической мембраны опухолевых клеток, которые принимают участие в передаче сигналов.

На данный момент вопрос о том, оказывает ли связанная с мембраной активность HSP70 влияние на соседние белки, такие как рецепторы или сигнальные молекулы еще остается нерешенным. Но тем не менее мембранная локализация HSP70 связана с различными заболеваниями, (Zhu YZ, 2012) в том числе с глиобlastомами. (Shevtsov MA, 2014)

Также мембранный HSP70 взаимодействует с фосфотидилсерином (PS) липидом, находящемся на внутренней стороне плазмолеммы. И появление его на внешней стороне мембраны рассматривается как ранний маркер апоптоза, который может инициировать распознавание умирающих клеток макрофагами. Предполагается что HSP70 способен перемещаться из внутренней в наружную сторону мембраны по средству транслокации PS, таким образом маркируя опухолевые клетки для иммунной системы. (Vega VL, 2008)

Свободный HSP70

Уровни HSP70 в сыворотке у пациентов с различными злокачественными новообразованиями, выше, чем у здоровых людей. Предполагается, что свободный HSP70 попадает в кровь высвобождаясь из погибающих раковых клеток.

Свободный HSP70, как было показано, оказывает иммуномодулирующую активность, особенно если к нему привязаны иммуногенные пептиды, такие как sLOX-1, SR-ASREC. После презентации пептидов, связанных HSP70, молекулам MHC происходит инициация CD8-антигенспецифического цитотоксического Т-клеточный ответа. (Schild H, 1999)

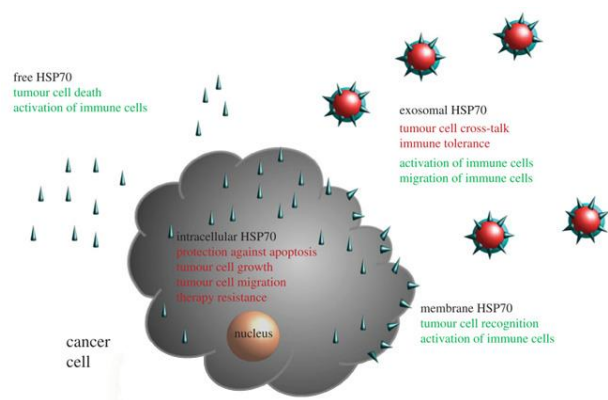


Рис. 7 Зависимость функции HSP70 в онкологических заболеваниях от его локализации. (Shevtsov, Huile, and Multhoff 2018)

2.4 HSP70 в EMT

HSP70 в EMT здоровых тканях и при фиброзе

Существуют данные о прямом участии HSP70 в процессе EMT 2ого типа, связанных с регенерацией и фиброзом.

Идиопатический фиброз легочный (IPF). Tanaka et al исследовали влияние экспрессии HSP70 на блеомицин-индуцированный легочный фиброз у мышей. (Tanaka et al. 2010)

Блеомицин-индуцированный фиброз и воспалительный ответ уменьшались у трансгенных мышей, сверхэкспрессирующих HSP70 по сравнению с мышами дикого типа. In vitro подавление экспрессии HSP70 стимулировало TGF- β 1-индуцированные EMT-подобные фенотипы эпителиальных клеток, но не влияло на TGF- β 1-зависимую активацию фибробластов.

Геранилгеранилацетон (GGA), клинически используемый препарат с активирующей экспрессией белков теплового шока, обеспечивал защиту от блеомицин- индуцированного легочного фиброза. Эти результаты предполагают, что HSP70 оказывает защитную роль, от легочного фиброза с помощью цитопротекторных эффектов и путем ингибирования TGF- β 1-зависимого EMT эпителиальных клеток и экспрессии провоспалительных цитокинов.

Известно, что высокие уровни глюкозы в растворе для перитонеального диализа могут способствовать фиброзу замещения тканей. В работе J. Yang исследовал влияние HSP70 на конечные продукты гликозилирования (AGE), индуцирующие EMT в перитонеальных мезотелиальных клетках, путем повышения экспрессии HSP70 и нокдауна HSP70 с использованием малой интерферирующей siRNA. Было показано, что AGE активировали изменения, связанные с EMT, включая потерю E-кадгерина, но также AGE индуцировали повышение активности HSP70, что приводило к частичному ингибированию EMT. Авторы предполагают что HSP70 увеличивает потенциал защиты клеток путем ингибирования сигнальных путей TGF- β /Smad, тем самым защищая клетки от AGE-индуцированного EMT. (J. Yang et al. 2015)

Li et al показали HSP70 взаимодействует с Smad2 и уменьшает трансдукцию сигнала TGF- β . Повышенная экспрессия HSP70 предотвращает зависящее от рецепторов фосфорилирование и ядерную транслокацию Smad2 и блокировала TGF- β -индуцированный эпителиально-мезенхимальный переход (EMT) в клетках HaCat. (Li, Kang, and Wang 2011)

Более того группа Zhou Y установила, что HSP70 может связываться со Smad3, ингибировать его фосфорилирование и транслокацию в ядро, тем самым предотвращая запуск программы EMT на ранних стадиях.

В данных статьях, авторы демонстрируют убедительные доказательства того, что повышенный синтез HSP70 приводит к блокировке развития EMT программы.

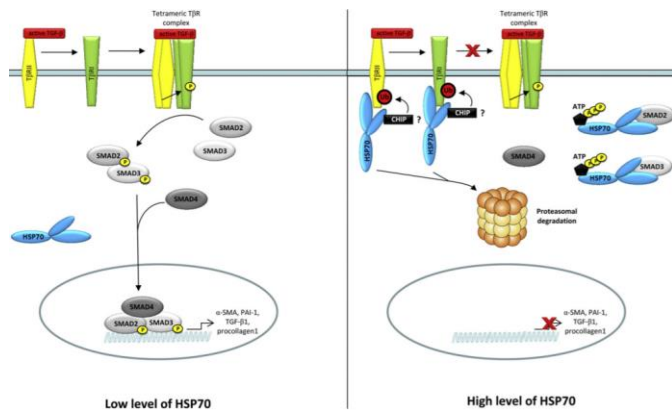


Рис 8. HSP70-зависимая регуляция Smad при фиброзе (Bellaye PS, et al. 2014.)

HSP70 в Emt в опухолевых клетках

С другой стороны, существуют исследования, которые косвенно подтверждают, что HSP70 способен стимулировать EMT в моделях метастазирующих раковых клеток.

Например, HSP70 стабилизирует Wasf3, который участвует в формировании ламеллоподий и мембранных рафлов (ruffles), что усиливает клеточную подвижность, а также инвазию через активацию матричных металлопротеиназ. Таким образом, ингибирование HSP70, которое приводит к инактивации Wasf3, снижает клеточную подвижность и способность к инвазии у раковых клеток. HSP70 стабилизирует WASF3, что приводит к полимеризации актина из глобулярного в фибриллярный. Что способствует формированию ламеллоподий и усиливает клеточную подвижность и инвазию. (Teng Y. 2012)

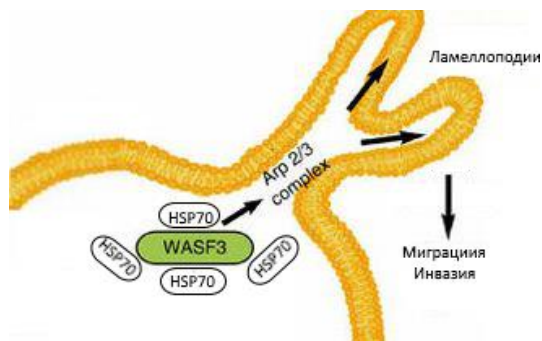


Рис. 9 HSP70 зависимая регуляция Wasf3 (По Jayatilaka H.2017 с изменениями)

Другой важный для раковых клеток белок – FAK (focal adhesion kinase) так же зависит от HSP70. FAK — это цитоплазматическая нерецепторная тирозинкиназа, принимающая участие в клеточной пролиферации, миграции и инвазии. FAK опосредованно способен положительно регулировать синтез матричных металлопротеиназ и негативно регулирует синтез E-кадгерина. С помощью метода деплеции АТФ было показано, что HSP70 препятствует каспаза-3-зависимой деградации FAK, тем самым способствуя активации EMT программы. Не смотря на всё это, наличие или отсутствие прямой связи HSP70 с сигнальными путями EMT-программы в раковых клетках до сих пор не было показано.

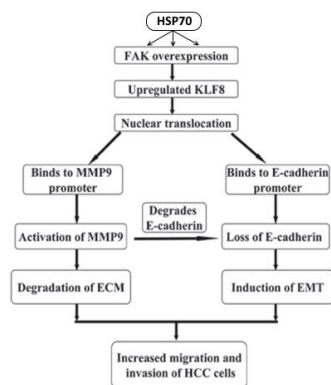


Рис. 10 HSP70-зависимая регуляция FAK

Материалы и методы

1. Культивирование клеток

Клеточная культура DLD1 была любезно предоставлена Балевым Н.А. Клетки культивировали на среде DMEM (Gibco, США) с добавлением 10% бычьей эмбриональной сыворотки (Gibco, США) и антибиотика гентамицина. Клетки сеяли на на флакон 25см² в концентрации 5-7х10⁵. Инкубировали при 37°C с 5% CO₂ в течении 2-3 дней.

Постоянный логарифмический рост клеток поддерживали посредством их пересева каждые 2-3 дня, для чего клетки снимали с подложки смесью растворов трипсина и Версена (соотношение 1:1). Пересев клеток осуществляли за сутки до эксперимента таким образом, чтобы в день эксперимента они занимали около 60-70% поверхности.

2. Бактериальная трансформация с помощью RbCl

Используемая плаزمида pcDNA3 Snail GFP была любезно предоставлена Тентлером Д.Г.

Для наращивания плазмиды использовали штамм бактерий E.coli - SBL4. Бактерии инкубировали ночь в при 37°C с постоянным перемешиванием. После чего 150мкл ночной культуры добавляли в 2мл свежей среды LB и оставляли на 1.5 часов при 37°C. Затем центрифугировали (Eppendorf Германия) 6000g 10минут +4°C. Осадок ресуспензировали в стерильном растворе для трансформации (10mM MOPS; 10mM RbCl pH7,0). После чего клетки еще раз центрифугировали 6000g 10минут +4°C. Супернатант удаляли, а осадок растворяли в 2ом растворе для трансформации (100mM MOPS, 50mM CaCl2 10mM RbCl, pH6,5). Инкубировали во льду в течении 30 минут 40мкл бактерий в растворе 2 и 10мкг плазмиды, затем резко вносили смесь в водяную баню, подвергая клетки тепловому шоку 43°C на 30 секунд. После чего быстро переносили бактерии обратно в лед. Добавляли 400мкл свежей среды LB, инкубировали с перемешиванием при 37°C в течении 1 часа. Распределяли клетки по твердой среде LB с агарозой и антибиотиком карбенецилином, инкубировали в течении 16 часов.

Выделение плазмидной ДНК с помощью LiCl

Наращивание трансформантов. Трансформантов переносили в 4мл LB на 8 часов. Затем 4мл клеток добавляли в 250 мл свежей стерильной LB с карбенецилином на 16 часов. Затем бактерии центрифугировали при +4°C 15 минут со скоростью 6000g. (Heraeus, Германия)

Осадок ресуспензировали в 10мл H2O и 20 мл раствора для выделения (200 mM NaOH; 1% SDS), и инкубировали на льду в течении 2 минут. После чего добавляли 15 мл 3М ацетата калия pH=5,5. И оставляли при комнатной температуре на 15 минут. Перемешивали и центрифугировали при +4°C 15 минут со скоростью 6000g. Супернатант фильтровали через фильтровальную бумагу.

В отфильтрованный супернатант добавляли 0,6 объема изопропанола, и оставляли при комнатной температуре 10 минут. Затем центрифугировали пробы в течении 1 часа при +4 со скорость 6000g. Супернатант удаляли, осадок растворяли в 1,5 мл воды. Далее добавляли 1,5 мл 10M LiCl и перемешивали до однородного помутнения. Инкубировали при -20°C 15 минут. После чего добавляли 100нг РНКазы и оставляли на 1 час при температуре 37°C.

Добавляли 7,5 мл 96% этанола и 300 мкл 3М ацетата натрия. И инкубировали 12 часов при -20°C. Центрифугировали 15 минут при +4° С 6000g. Супернатант удаляли, осадок растворяли в 200 мкл стерильного ТЕ буфера (10мМ Tris-HCl pH8.0; 1мМ EDTA). Концентрацию плазмиды измеряли с помощью прибора NanoPhotometer (Implen, Германия) в спектре поглощения 260 нм. Кроме того, качество выделенного вектора проверяли с помощью ДНК электрофореза.

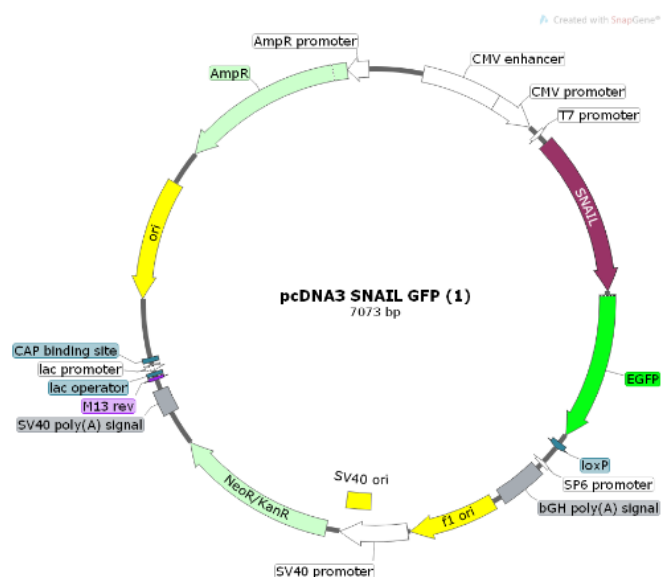


Рис. 11 Карта плазмиды pcDNA3 Snail GFP

Электрофорез ДНК в агарозном геле

Готовили 1% раствор агарозы в TAE буфере (Tris 40мМ; EDTA 1 мМ; ледяная уксусная кислота 20мМ). Нагревали на плитке до полного растворения, остужали. Добавляли бромистый этидий в концентрации 0,5мкг/мл геля. Заливали гель и ставили его в камеру (Cleaver scientific, Великобритания). Добавляли пробы: 1мкл буфера для нанесения (30% глицерин, 0,25% бромфеноловый синий, 69,75% H₂O), 1мкг плазмиды pcDNA3 Snail, 8мкл H₂O. Пробы разгоняли на 90V 5 минут, 120V 20минут.

Фотографировали гель с помощью на приборе Chemidoc XRS+ (Bio-Rad, США).

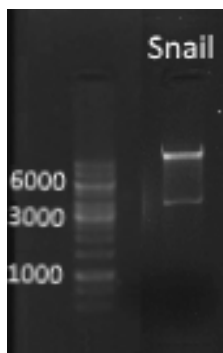


Рис. 12 ДНК-электрофорез плазмиды pcDNA3 Snail.

3. Клеточная плазмидная трансфекция

Клетки DLD1 рассеивались на 6 луночную плату в концентрации 8×10^5 кл/лунка, через 16 часов их промывали раствором Хенкса (Биолот, Россия), затем инкубировались в среде DMEM (Gibco, США) без добавления бычьей эмбриональной сыворотки в течении 2 часов.

Смешивали полиэтиленимин (PEI) pH=7 0,3 мкг; и OPTIMEM (Gibco, США) 25мкл – 1 лунка 96ти луночной платы, инкубировали 10 минут при 37°C. Также смешивали плазмиду pcDNA3 Snail 1мкг и 25мкл OPTIMEM. Смешивали растворы PEI и плазмиды и инкубировали 20 минут при 37°C для образования комплекса PEI с вектором.

Клетки промывали раствором Хенкса, добавляли 50 мкл OPTIMEM и 50 мкл смеси PEI и плазмиды. Оставляли на 20 часов. После чего меняли среду на DMEM с 10% FBS. Через 48 часов проверяли наличие экспрессии зеленого флуоресцентного белка на микроскопе (Evos, Termofisher, США). Далее селектировали клетки в течении 15 дней антибиотиком генетицином (G418).

4. Лентивирусная трансдукция клеточной линии DLD1 с помощью полибрена

Перед проведением трансдукции вычислялась сублетальная доза селективного антибиотика для клеточной линии DLD1. Были посеяны 10000 клеток/лунка на 96 луночную плату. Через 18 часов пуромидин титровали от 5мкг до 0,25мкг, каждую концентрацию добавляли в трех повторностях. Через 48 часов оценивали процент живых клеток трипановым синим.

Для трансдукции использовали вектора pGPV-Hspal с малой РНК образующей шпильки (shRNA) к мРНК HSP70:

Hspal- top (60bp 5'-

gatccGAACCCGCAGAACACCGTGTTCGAGAACACGGTGTTCGCGGGTCTTTTg -3'

Hspal- Bottom (60bp)5'-

aattcAAAAAGAACCCGCAGAACACCGTGTTCGAGAACACGGTGTTCGCGGGTTCg3'

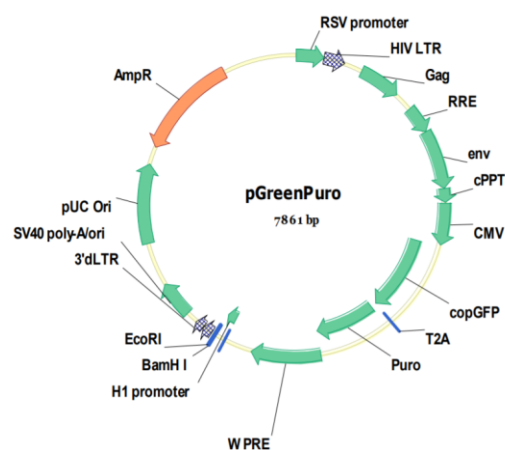


Рис. 13 Вектор pGreenPuro в который были вставлены последовательности shRNA к HSP70

Сеяли 10000 клеток на лунку 48-луночной платы. Через 16 часов добавляли 4 вирусные единицы на 1 клетку – 6×10^4 4мг/мл, полибрена pH 7.0, лунку и клеточную среду DMEM (Gibco, США) до 250 мкл.

Плату центрифугировали (Bio-Rad, США) 10 минут 700 оборотов в минуту.

В течении 2 дней инкубировали клетки с вирусом, после чего проверяли наличие экспрессии зеленого флуоресцентного белка на микроскопе (Evos, ThermoFisher, США). Затем сеяли контрольные клетки, не подвергавшиеся вирусной трансдукции и добавляли сублетальную дозу пуромицина – 0,75 мкг/мкл. Селекцию проводили в течении 10ти дней.

Получение понижения экспрессии в последствии проверяли с помощью количественного ПЦР и вестен-блотинга.

5. Выделение РНК из клеточных лизатов

Клетки промывали раствором фосфатно-солевого буфера 3 раза. Затем лизировались раствором Trizol (Invitrogen, США). Далее все манипуляции производили во льду. К лизату добавляли хлороформа 0,2:1. Смесь перемешивали с помощью Vortex (BioSan, Россия). Центрифугировали пробы при +4°C (Eppendorf, Германия) со скоростью 12000g в течении 15 минут до разделения на три фракции. Отбирали верхнюю фракцию и высаживали РНК добавляя к ней охлажденный изопропанол 2:1 от изначального количества Trizol. Инкубировали 10 минут после чего центрифугировали на +4. Удаляли супернатант, а образовавшийся осадок промывали охлажденным 75% этанолом 3 раза. Отбирали этанол, высушивали осадок и растворяли его в химически чистой теплой воде. Далее измеряли концентрацию NanoPhotometer (Implen, Германия) и аликвотили пробы по 2мкг РНК. После чего хранили пробы при -80°C.

Получение кДНК с помощью обратной транскрипции

В пробы с 2мкг РНК добавляли по 20пкМ случайных праймеров (Евроген, Россия) и 12мкл воды. После чего для разрушения вторичных структур в течении 5 минут нагревали при 65°C после чего пробы немедленно ставили в лед.

Далее добавляли отПЦР микс (Евроген, Россия): 1х буфер для ПЦР, смесь dNTP 10мМ, стерильная вода, DTT 20мМ, в последнюю очередь добавляли MMLV ревертазу.

Пробы ставили в амплификатор (iCycler, Bio-Rad, США) на +42°C 60 минут, +70°C 5 минут, затем +4°C.

Количественный ПЦР в реальном времени;

Использовали qPCRMix (Евроген, Россия), в который входят: Taq-полимераза, Syber-Green, dNTP, Mg²⁺, ПЦР буфер. Добавляли матрицу кДНК, а также праймеры:

HSP70:

Прямой праймер: 5' -AGCTGGAGCAGGTGTGTAAC-3'

Обратный праймер: 5' -CAGCAATCTTGGAAAGGCCC-3'

Slug (SNAI2):

Прямой праймер: CTGGTCAAGAAGCATTTCAACG

Обратный праймер: TTTTCTAGACTGGGCATCGCA

Snail:

Прямой праймер: TCCGGAGATCCTCAACCCC

Обратный праймер: CCTTTCGAGCCTGGAGATCC

Для каждой пробы делали по три повторности. Амплификацию и детекцию осуществляли с помощью CFX96 (Bio-Rad, США), для всех праймеров использовали следующую программу:

1. 95°C 5 мин - денатурация
2. 95°C 10 секунд - денатурация
3. 60°C 30 секунд - отжиг праймеров
4. 72°C 30 секунд - элонгация
5. Детекция флуоресценции
x40 циклов возвращение к шагу 2
6. Анализ кривых плавления

7. SDS-PAGE электрофорез по Лэммли и Вестернблоттинг

Выделение белка из клеточных лизатов. Клетки промывали раствором фосфатно-солевого буфера 3 раза. Далее лизировали раствором Low Ripa (20mM TrisHCl pH7.5, 150mM NaCl, 2mM EDTA, 0.5% Triton x100, 1mM PMSF.) далее с помощью ультразвука разрушали клеточные структуры. Центрифугировали клетки 12000g (Minispin Eppendorf, Германия) в течении 10 минут. Супернатант, отбирали, измеряли концентрацию белка с помощью раствора Брэдфорда на NanoPhotometer (Implen, Германия). Необходимое количество белка высаживали ацетоном 6:1 в течении ночи при -20°C. Затем центрифугировали (Minispin Eppendorf, Германия), пробы со скоростью 12000g в течении 10 минут. Супернатант удаляли, а осадок растворяли в буфере для нанесения проб (0.625 M TrisHCl pH 6.8, 20% глицерол, 0.1% SDS, бромфеноловый синий) из расчета 20мкг белка на 10мкл. После чего кипятили пробы с 10% меркаптоэтанолом в течении 5 минут при 100°C.

На заливочном столике системы Mini Protean (BioRad, США), заливали 11% полиакриламидный гель. (Акриламид; Бисактриламид; Tris-HCl pH=8,8; SDS 0,1%;PSA; TEMED). В лунки добавляли по 20мкг белка. Белки разделялись по молекулярному весу в течении 2,5 часов, при 220V, 15mA.

Далее с помощью той же системы осуществляли перенос белков (400mA, 70V – 1,5 часа) на нитроцеллюлозную мембрану, предварительно активированную 96% спиртом.

Мембрану блокировали 1 час 5% сухим обезжиренным молоком. Затем красили мембрану антителами GAPDH (Abscam, Великобритания). После отмывки 3 раза по 5 минут PBS с 5% Tween красили антителами к HSP70 (клон 3b5 полученный в нашей лаборатории). Далее после следующей отмывки, красили мембрану вторичными антителами GAM (Jackson

ImmunoResearch Inc, США) с пероксидазной меткой. Проявляли мембрану на приборе Chemidoc (Bio-Rad, США), с помощью ECL раствора (0.125 М люминол, 68 mM кумаровая кислота, 1.5 М TrisHCl pH 8.5)

6. Тест оценки миграции (заращение царапины)

На 6ти луночную плату сеяли клетки в концентрации $4,5 \times 10^5$ на лунку. Через 24 часа, когда конфлюэнтный монослой достиг 85%, с помощью наконечника 10мкл наносили царапину. Фотографировали клетки сразу же после нанесения царапины – 0 часов и через 24 часа.

7. Статистический анализ

Обработка данных была проведена с использованием однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA тест) с добавлением post-hoc теста в программе Microsoft Excel

Результаты и обсуждения

1. Получение клеточной линии DLD1 с пониженным содержанием HSP70 с помощью лентивирусной трансдукции

Для оценки особенностей функционирования HSP70 в эпителиально-мезенхимальном переходе, нам необходимо было получить линию с пониженной экспрессией этого белка. Для успешной селекции после лентивирусной трансдукции нам необходимо было определить сублетальную дозу антибиотика пурамицина для клеточной линии DLD1. Оценка количества живых клеток трипановым синим после 48 часов инкубации с пурамицином показала, что 75% умерших клеток наблюдалось в пробах с 0,75 мкг пурамицина. Далее была проведена лентивирусная трансдукция с вектором содержащем shPHK к HSP70, и мы получили клеточную линию, синтезирующую зеленый флуоресцирующий белок.

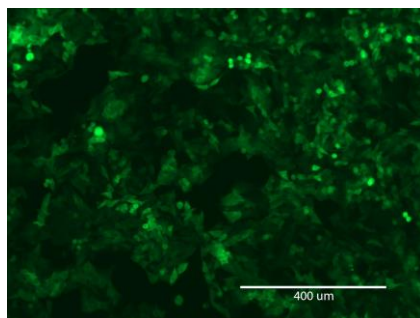


Рис. 14 Культура клеток DLD1 после лентивирусной трансдукции

После введения лентивирусной конструкции мы проверили понижение экспрессии HSP70 с помощью вестернблоттинга. В полученной нами клеточной линии, наблюдалось снижение синтеза HSP70 на 60%.

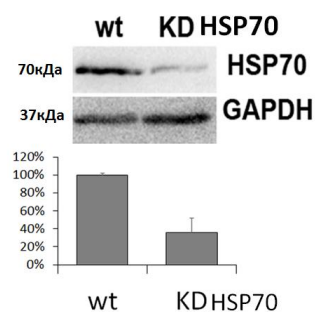


Рис. 15 Понижение экспрессии HSP70 после лентивирусной трансдукции.

Также нам показалось необходимым проверить количество HSP70 на уровне мРНК с помощью qPCR. Мы наблюдали снижение синтеза HSP70 на 40%.

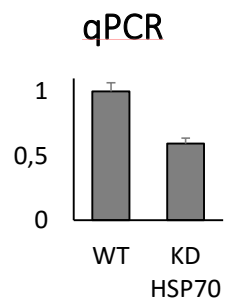


Рис. 16 Понижение экспрессии HSP70 после лентивирусной трансдукции.

Таким образом мы получили клеточную линию KD HSP70, которую использовали в дальнейших экспериментах.

2. Получение клеточной линии DLD1 с повышенным содержанием snail с помощью плазмидной трансфекции pcDNA3 Snail

Дальше перед нами стояла задача получить модель EMT, с помощью трансфекции двух клеточных линий DLD1 wt и DLD1 KD HSP70 плазмидой pcDNA3 Snail.

Для дальнейшей селекции мы также вначале определяли сублетальную дозу селектирующего антибиотика –G418. После 10 дневной инкубации мы оценивали процент жизнеспособных клеток с помощью трипановго синего и 75% умерших клеток наблюдалось при концентрации G418 400мкг.

После чего мы трансфецировали клетки DLD1 wt и DLD1 KD HSP70 вектором pcDNA3 Snail и после селекции получили еще 2 постоянных клеточные сублинии – DLD1 Snail, и DLD1 KD HSP70 Snail.

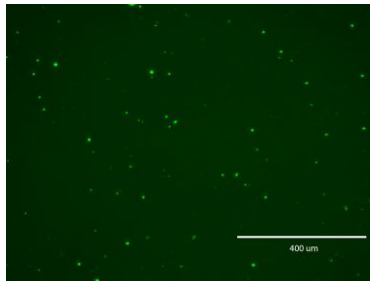


Рис. 17 Повышение экспрессии Snail меченым зеленым флуоресцентным белком.

Для получения подтверждения повышения увеличения экспрессии Snail мы также его уровень с помощью qPCR.

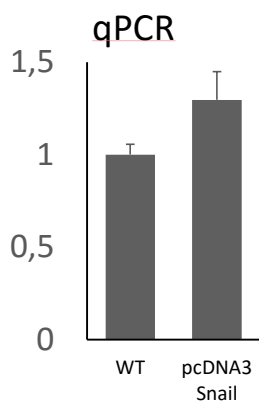


Рис. 18 Повышение экспрессии Snail показанное методом qPCR

Наблюдается повышение синтеза мРНК Snail на 25%.

Таким образом мы получили 4 клеточные сублинии, которые можно было использовать DLD1 wt; DLD1 KD HSP70; pcDNA3 Snail; DLD1 KD HSP70 pcDNA3 Snail.

3. Количественная оценка уровня экспрессии Snail и Slug методом qPCR в полученных сублиниях.

Для оценки влияния HSP70 на экспрессию таких мезенхимальных маркеров как Slug и Snail был проведен qPCR всех полученных ранее клеточных сублиний.

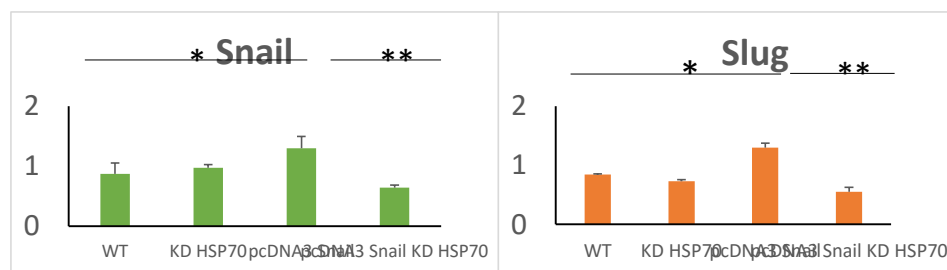


Рис. 19 График количественной экспрессии Snail и Slug в 4х клеточных сублиниях.

Наблюдается одинаковый уровень мРНК slug и Snail в клетках дикого типа и в клетках с пониженным HSP70. Также наблюдается повышение экспрессии этих мезенхимальных маркеров в клетках с pcDNA3 Snail, что совпадает с предыдущими нашими результатами.

Однако в случае клеточной линии DLD1 KD HSP70 pcDNA3 Snail наблюдается значительное понижение уровня экспрессии Snail и Slug. Можно предположить, что это связано с положительной регуляцией HSP70 Smad, транскрипционного фактора, опосредующего синтез Slug и Snail.

В литературе существуют данные о взаимодействии HSP70 и Smad, (Li Y. 2011) (Tanaka K. 2010). Однако все эти исследования показывают ингибирующую функцию HSP70. Так Li Y et al показали, что HSP70 связывается со Smad2/3 транскрипционного фактора, опосредующего синтез Snail и Slug, блокируя для этого белка возможность фосфорилироваться и транслоцироваться в ядро. Интересно отметить что все выше перечисленные исследования связаны с механизмами, которые происходят в здоровых клетках, либо при фиброзе.

На данном этапе, остается только предположить, что в случае малигнизации клеток характер взаимодействия HSP70 и Smad2/3 изменяется. Возможно в данном случае HSP70 уже начинает играть роль трансдуктора сигнала от TGF-В к Smad2/3, возможно за счет своей шаперонной функции HSP70 способствует его правильной укладке и фосфорилированию, что в свою очередь способствует его транслокации в ядро и активацией синтеза различных транскрипционных факторов опосредующих EMT, в том числе Slug и Snail

Тест зарастание царапины (миграционный тест).

Повышенная миграционная способность характерна для клеток, прошедших EMT. Для проверки миграционной активности клеток, был использован тест зарастания царапины. Данный эксперимент мы проводили в течении 24 часов с двумя контрольными точками непосредственно сразу после нанесения царапины и через 24 часа.

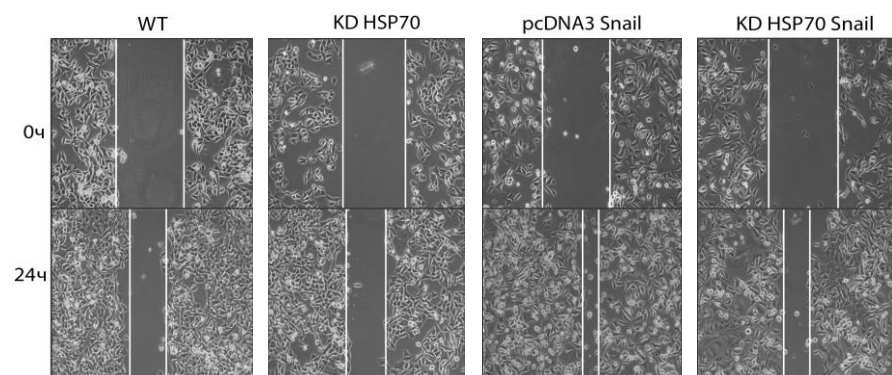


Рис. 20 Скорость миграции разных клеточных сублиний

Клетки с повышенной экспрессией Snail, мигрируют активнее так как прошли EMT.

Миграционные способности клеток с пониженным HSP70 не сильно отличаются от клеток дикого типа, но тем не менее наблюдается снижение скорости миграции. Это, в целом совпадает с данными литературы.

При этом наблюдается снижение миграционной активности у клеток KD HSP70 Snail, по сравнению с клетками с pcDNA3 Snail, но при этом они мигрируют быстрее чем клетки дикого типа.

Это можно объяснить тем, что множество молекулярных процессов задействовано в EMT, и, возможно HSP70 участвует в регуляции только некоторых из них. Так возможно это связано со стабилизацией

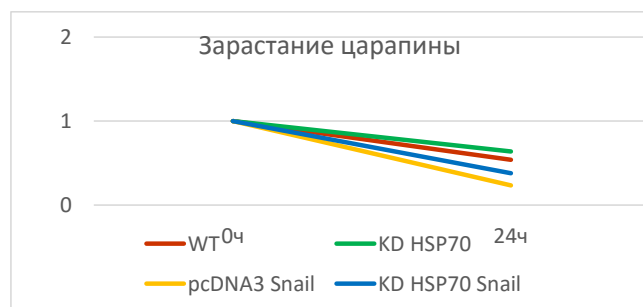


Рис. 17 Схема: скорость миграции разных клеточных сублиний.

Выводы

1. Получена клеточная линия с пониженной экспрессией HSP70.
2. Разработана клеточная модель EMT на основе плазмидной трансфекции вектором pcDNA3 Snail. Таким образом были получены 4 сублинии DLD1.
3. Проведена оценка миграционных характеристик у клеток разного типа. А также количественный анализ уровня экспрессии Snail и Slug.
4. Показано, что при подавлении экспрессии HSP70, понижается миграционная активность клеток, прошедших EMT, что может свидетельствовать о его стимулирующем влиянии на EMT-переход в раковых клетках.

Список литературы

- Cano, Amparo, Mirna A Pérez-moreno, Isabel Rodrigo, Annamaria Locascio, María J Blanco, Marta G Barrio, Francisco Portillo, and M Angela Nieto. 2000. "The Transcription Factor Snail Controls Epithelial – Mesenchymal Transitions by Repressing E-Cadherin Expression" 2 (February).
- Gonzalez, Medici. 2014. "Signaling Mechanisms of the Epithelial-Mesenchymal Transition." *Sci Signal* 7 (344): re8. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005189>.Signaling.
- Hay, Elizabeth D. 2005. "The Mesenchymal Cell , Its Role in the Embryo , and the Remarkable Signaling Mechanisms That Create It," no. May: 706–20. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20345>.
- Hirohashi, Setsuo. 1998. "Inactivation of the E-Cadherin-Mediated Cell." *The American Journal of Pathology* 153 (2). American Society for Investigative Pathology: 333–39. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65575-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65575-7).
- Kalluri, Raghu, and Robert a Weinberg. 2009. "Review Series The Basics of Epithelial-Mesenchymal Transition." *Journal of Clinical Investigation* 119 (6): 1420–28. <https://doi.org/10.1172/JCI39104>.1420.
- Kou, Yu, Lei Li, Hong Li, Yuhui Tan, Bin Li, Kun Wang, and Biaoyan Du. 2016. "SC." *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.09.061>.
- Li, Yihao, Xianjiang Kang, and Qiang Wang. 2011. "HSP70 Decreases Receptor-Dependent Phosphorylation of Smad2 and Blocks TGF- β -Induced Epithelial-Mesenchymal Transition." *Journal of Genetics and Genomics* 38 (3). Elsevier Limited and Science Press: 111–16. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2011.02.001>.
- Mayer, Matthias P. 2013. "Hsp70 Chaperone Dynamics and Molecular Mechanism." *Trends in Biochemical Sciences* 38 (10). Elsevier Ltd: 507–14. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.08.001>.
- Meigs, Thomas E, Mary Fedor-chaiken, Daniel D Kaplan, Robert Brackenbury, Patrick J Casey, Thomas E Meigs, Mary Fedor-chaiken, Daniel D Kaplan, Robert Brackenbury, and Patrick J Casey. 2002. "TRANSDUCTION : G α 12 and G α 13 Negatively Regulate the Adhesive Functions of Cadherin G α 12 and G α 13 Negatively Regulate the Adhesive Functions of

Cadherin *.” <https://doi.org/10.1074/jbc.M201984200>.

Oda, Hiroki, Shoichiro Tsukita, and Masatoshi Takeichi. 1998. “Dynamic Behavior of the Cadherin-Based Cell – Cell Adhesion System during Drosophila Gastrulation” 450: 435–50.

Polireddy, Kishore, and Qi Chen. 2016. “J O U R N a L O F C a N c E R Cancer of the Pancreas : Molecular Pathways and Current Advancement in Treatment” 7. <https://doi.org/10.7150/jca.14922>.

Potenta, S, E Zeisberg, and R Kalluri. 2008. “The Role of Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer Progression,” 1375–79. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604662>.

Prat, Aleix, Joel S Parker, Olga Karginova, Cheng Fan, Chad Livasy, Jason I Herschkowitz, Xiaping He, and Charles M Perou. 2010. “Phenotypic and Molecular Characterization of the Claudin-Low Intrinsic Subtype of Breast Cancer.”

Ramis-conde, Ignacio, Mark A J Chaplain, Alexander R A Anderson, and Dirk Drasdo. 2009. “Multi-Scale Modelling of Cancer Cell Intravasation : The Role of Cadherins in Metastasis” 16008. <https://doi.org/10.1088/1478-3975/6/1/016008>.

Shevtsov, Maxim, Gao Huile, and Gabriele Multhoff. 2018. “Membrane Heat Shock Protein 70: A Theranostic Target for Cancer Therapy.” *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 373 (1738). <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0526>.

Tanaka, Ken Ichiro, Yuta Tanaka, Takushi Namba, Arata Azuma, and Tohru Mizushima. 2010. “Heat Shock Protein 70 Protects against Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Mice.” *Biochemical Pharmacology* 80 (6). Elsevier Inc.: 920–31. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.05.025>.

Tran, Nhan L, Deanna G Adams, R Richard, Ronald L Heimark, Nhan L Tran, Deanna G Adams, Richard R Vaillancourt, and Ronald L Heimark. 2002. “TRANSDUCTION : Signal Transduction from N-Cadherin Increases Bcl-2 : REGULATION OF THE PHOSPHATIDYLINOSITOL 3-KINASE / Akt PATHWAY BY HOMOPHILIC ADHESION AND ACTIN Signal Transduction from N-Cadherin Increases Bcl-2.” <https://doi.org/10.1074/jbc.M200300200>.

Weinberg, Robert. 2006. *The Biology of Cancer*.

Xie, Lu, Brian K Law, Anna M Chytil, Kimberly A Brown, Mary E Aakre, and Harold L Moses.

2004. "Activation of the Erk Pathway Is Required for TGF- β 1 – Induced EMT In Vitro 1." *Neoplasia* 6 (5). Neoplasia Press, Inc.: 603–10. <https://doi.org/10.1593/neo.04241>.

Yang, Jun, Tiechui Zhu, Xiangdong Liu, Lianyun Zhang, Yuxin Yang, Jie Zhang, and Minghao Guo. 2015. "Heat Shock Protein 70 Protects Rat Peritoneal Mesothelial Cells from Advanced Glycation End-Products-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition through Mitogen-Activated Protein Kinases/extracellular Signal-Regulated Kinases and Transforming Growth Fact." *Molecular Medicine Reports* 11 (6): 4473–81. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3271>.

Yang, Muh-hwa, Dennis Shin-shian Hsu, Hsei-wei Wang, Hsiao-jung Wang, Hsin-yi Lan, Wen-hao Yang, Chi-hung Huang, et al. 2010. "Bmi1 Is Essential in Twist1-Induced Epithelial – Mesenchymal Transition." *Nature Publishing Group* 12 (10). Nature Publishing Group: 982–92. <https://doi.org/10.1038/ncb2099>.

Zeisberg, Michael, and Eric G Neilson. 2009. "Review Series Personal Perspective Biomarkers for Epithelial-Mesenchymal Transitions" 119 (6): 1429–37. <https://doi.org/10.1172/JCI36183>.protected.